



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 55 106 A1 2004.06.09

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 55 106.5  
(22) Anmeldetag: 24.11.2002  
(43) Offenlegungstag: 09.06.2004

(51) Int Cl.: **A61K 31/57**  
A61K 9/127

(71) Anmelder:  
Novosom AG, 06120 Halle, DE  
  
(74) Vertreter:  
Anwaltskanzlei Gulde Hengelhaupt Ziebig &  
Schneider, 10117 Berlin

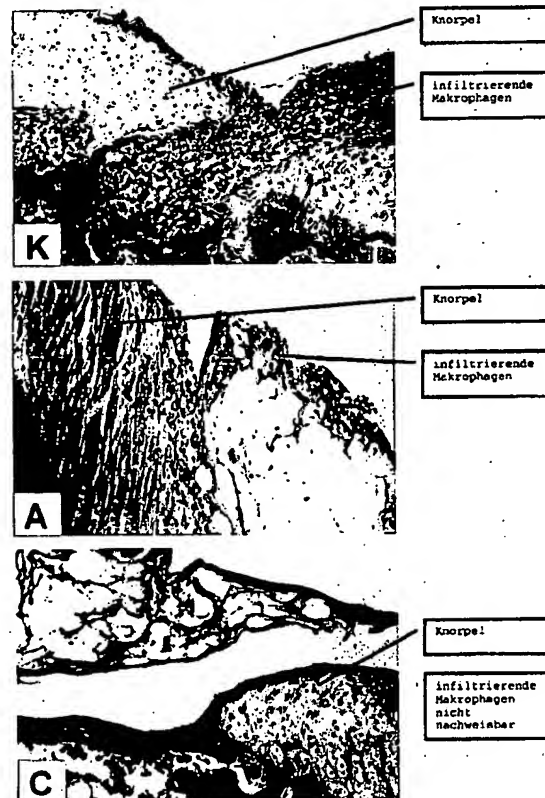
(72) Erfinder:  
Panzner, Steffen, 06108 Halle, DE; Bräuer, Rolf,  
99510 Apolda, DE; Kinne, Raimund W., 07743  
Jena, DE; Rauchhaus, Una, 06108 Halle, DE

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Liposomale Glucocorticoide**

(57) Zusammenfassung: Es werden liposomale Zubereitungen von Glucocorticoiden offenbart. Dabei sind die Glucocorticoide wasserlöslich und befinden sich im wässrigen Binnenraum der Liposomen. Die Liposomen sind frei von hydrophilen Polymeren wie etwa PEG. Die Zubereitungen werden zur Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen eingesetzt.



BEST AVAILABLE COPY

USSN: 10/565360 Filed 1/20/2006  
Applicant: Arkady Mendel  
Docket: 355908-3451 Ref No: F1

## Beschreibung

## Stand der Technik

[0001] Glucocorticoide sind eine Klasse von Substanzen, die seit langem zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden. Die Einarbeitung von Wirkstoffen aus dieser Klasse in liposomale Formulierungen ist konzeptionell bekannt und mehrfach beschrieben. Dabei ist die Formulierung der unmodifizierten Arzneiform schwierig, da liposomal eingeschlossenes Material innerhalb von wenigen Stunden wieder freigesetzt wird. Die DE 2712030 offenbart demgegenüber, dass lipophil substituierte Glucocorticoide sich stabil in Liposomen einschliessen lassen. Nachteilhaft an diesen Formulierungen ist der Austausch des hydrophoben Wirkstoffderivats mit Plasmabestandteilen und eine geringe in vivo-Stabilität der Formulierungen.

[0002] Eine Verbesserung demgegenüber wird in der WO 94/07466 offenbart. Durch die Verwendung von PEG (Polyethylenglykol)-modifizierten Lipiden lässt sich die in vivo-Stabilität der Formulierung erhöhen und insbesondere die Zirkulationszeit der Liposomen verlängern. Konzeptionell zielt diese Verbesserung darauf, den unspezifischen Verlust von eingebrachten Liposomen im retikuloendothelialen System zu vermindern und dadurch die spezifische Extravasierung von Liposomen an den Entzündungsherden zu ermöglichen oder zu verbessern.

[0003] Neuere Entwicklungen wie die EP 1046394 und die WO 02/45688 entwickeln diesen Weg weiter, wobei wasserlösliche Glucocorticoide, insbesondere deren Phosphatester, in die PEG-modifizierten Liposomen eingeschlossen werden.

[0004] Der nun erreichte Stand der Technik hat den Nachteil, dass die erzielten Verbesserungen im Zirkulationsverhalten im wesentlichen nur bei der erstmaligen Gabe der Formulierung erreicht werden können. Bei mehrmaliger Gabe von PEG-modifizierten Liposomen wird die Bildung von Antikörpern nachgewiesen. Deren Bindung führt bei wiederholter Anwendung zu einer Verringerung der Zirkulationshalbwertszeit und ist pharmakologisch unerwünscht.

## Aufgabenstellung

[0005] Die Aufgabe der Erfindung bestand daher darin, liposomale Formulierungen von Glucocorticoiden bereitzustellen, die die genannten Nachteile vermeiden und eine vorteilhafte Wirkung gegenüber dem freien Wirkstoff aufweisen.

[0006] Die erfindungsgemässe Aufgabe wird gelöst durch den Einschluss von wasserlöslichen Glucocorticoiden in Liposomen, die im wesentlichen frei sind von konjugierten Polymeren, insbesondere frei von PEG-Lipiden.

[0007] Im überraschenden Gegensatz zur nahegelegten technischen Lehre wurde gefunden, dass auch liposomale Zubereitungen von Glucocorticoiden, die ohne den Zusatz von PEG-Lipiden hergestellt wurden, bei systemischer Anwendung hinreichend stabil sind und eine sehr vorteilhafte Wirkung gegenüber dem freien Glucocorticoid aufweisen. So wird bei gleicher Wirkstoffmenge ein erheblich besserer therapeutischer Effekt beobachtet. Eine antigeninduzierte Arthritis in Ratten konnte mit 1 mg liposomalem Dexamethasonphosphat pro kg Körpergewicht nahezu vollständig unterdrückt werden. Tiere, die eine identische Dosis des unverpackten Wirkstoffs erhielten, entwickelten nach kurzer Besserung alle Symptome des Tiermodells.

[0008] Bevorzugt werden zur Formulierung wasserlöslicher Glucocorticoide solche Liposomen bereitgestellt, die in Blut und Serum über einige Stunden stabil sind und unter diesen Bedingungen keine Aggregate bilden. Besonders bevorzugt werden Liposomen mit einer Grösse zwischen 150 und 500 nm verwendet.

[0009] Solche Liposomen sind dem Fachmann bekannt und umfassen auch Liposomen, die aus gesättigten Phospholipiden und Cholesterol aufgebaut sind. In einer bevorzugten Ausführung der erfinderischen Lehre werden zum Aufbau der Liposomen die folgenden Lipide eingesetzt:

Dipalmitoylphosphatidylcholin, Distearoylphosphatidylcholin, Dipalmitoylphosphatidylglycerol, Distearoylphosphatidylglycerol, Dipalmitoylphosphatidylserin, Distearoylphosphatidylserin, Cholesterol. Unter den Mischungen dieser Substanzen sind solche bevorzugt, die einen Anteil negativer Ladungsträger von nicht mehr als 20 mol% aufweisen. Weiter bevorzugt sind solche Mischungen, bei denen der Anteil negativer Ladungsträger zwischen 5 und 15 mol% liegt. Phosphatidylglycerole und Phosphatidylserine sind negative Ladungsträger in solchen Membranen.

[0010] Die erfindungsgemäss bevorzugten Mischungen von Lipiden umfassen bevorzugt solche, die entweder kein Cholesterol oder zwischen 35 und 50 mol% Cholesterol enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind Liposomen, die zwischen 35 und 45% Cholesterol enthalten.

[0011] In einer weiteren bevorzugten Ausführung der Erfindung werden Liposomen verwendet, deren Oberflächenladung sich mit dem pH-Wert der Umgebung ändert. Solche pH-sensitiven Liposomen sind ebenfalls bekannt und umfassen insbesondere Cholesterolhemisuccinat (CHEMS), da dessen Carboxygruppe durch unterhalb von pH5 mehr und mehr entladen wird. Mit Vorteil wird dieses Lipid in Verbindung mit Phosphatidyle-

thanolamin verwendet. Solche Liposomen mit einem Gehalt von 35 ... 50 mol% CHEMS und 65 ... 50 mol% Phosphatidylethanolamin sind bei neutralem pH stabil und zerfallen bei einem pH unterhalb von 5, wie er etwa bei der endosomalen Aufnahme erreicht wird. Anstelle des CHEMS kann auch ein anderes pH-seinsitives Lipid eingesetzt werden, beispielsweise Phosphatidylserin.

[0012] Die WO 02/066489 und die WO 02/066012 beschreiben weitere pH-sensitive Liposomen, der Ladung sich bei sinkendem pH-Wert nicht nur verringert, sondern auch umkehrt (positiviert). Auch solche Liposomen sind für die Ausführung der Erfindung bevorzugt, da sie im Serum stabil sind und keine Aggregate bilden. Der Offenbarungsgehalt der beiden Referenzen sei an dieser Stelle ausdrücklich mit in die Beschreibung der Erfindung aufgenommen.

[0013] Methoden zur Herstellung der wirkstoffhaltigen Liposomen sind dem Fachmann bekannt. Mit besonderem Vorteil werden die Lipide in einem pharmakologisch akzeptablen Alkohol wie Ethanol, Isopropanol oder 1,2-Propandiol oder auch in DMSO gelöst und unter schnellem Mischen in die wässrige Lösung des Wirkstoffes verdünnt. Bei geeigneter Prozessführung, beispielsweise bei einer 10fachen Verdünnung der organischen in die wässrige Phase, entstehen Liposomen im gewünschten Grössenbereich zwischen 150 und 500nm. Es ist dann keine weitere Veränderung der Liposomen durch Homogenisation oder Extrusion notwendig. Nicht eingeschlossener Wirkstoff kann abgetrennt werden. Dazu eignen sich Verfahren wie Gelfiltration, Zentrifugation oder auch Dialyse, besonders Tangentialflussdialyse.

[0014] Die Glucocorticoide sind schlecht in Wasser löslich und in liposomaler Form wenig stabil. Gut wasserlöslich sind insbesondere die Phosphatester, Sulfatester oder Dicarbonsäureester oder Additionssalze oder die Glycoside der Wirkstoffe. Es können bevorzugt die Mono- oder Disalze eingesetzt werden, ganz besonders bevorzugt die Natrium- oder Kaliumsalze der Glucocorticoidphosphate oder -succinate.

[0015] Beispielhafte Verbindungen aus dieser Gruppe sind Dexamethasonphosphat, Prednisolonphosphat, Methylprednisolonphosphat, Prednisolonsuccinat, Methylprednisolonsuccinat, Bemethasonphosphat, Desonidphosphat, Hydrocortisonphosphat, Hydrocortisonsuccinat, Prednisolatmahydrochlorid, Prednisonphosphat oder Triamcinoloneacetonidphosphat

[0016] Die erfindungsgemässe Lehre findet Anwendung bei der Behandlung von inflammatorischen und Autoimmun- Erkrankungen. Dazu gehören unter anderem die rheumatische Arthritis, Neurodermitis, Psoriasis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Multiple Sklerose und andere mehr. Auch zur Unterdrückung der Abstossung von Transplantaten oder bei der Behandlung des Typ-1-Diabetes können liposomale Formulierungen von Glucocorticoiden mit Vorteil verwendet werden.

#### Abbildungsunterschriften:

[0017] **Fig. 1:** Gelenkschwellung der arthritischen Tiere über den Untersuchungszeitraum von 21 Tagen nach Auslösung der Arthritis im rechten Knie im Vergleich zum gesunden linken Knie

[0018] **Fig. 2:** Histologische Schnitte der arthritischen Kniegelenke. Hämatoxylin/Eosin-Färbung, 92fache Vergrößerung

K – Formulierung K, starke Entzündung und Knorpel- und Knochendestruktion A – Formulierung A, geringfügig entzündliche Infiltration C – Formulierung C, keine Entzündungsreaktion

#### Ausführungsbeispiel

[0019] Im folgenden soll die Ausführung der erfinderischen Lehre an einigen Beispielen verdeutlicht werden, ohne das sie auf diese Beispiele beschränkt ist.

#### Abkürzungen:

[0020] HistChol N $\alpha$ -Histidinyl-Cholesterolemisuccinat  
 DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium  
 MoChol 4-(2-Aminoethyl)-Morpholino-Cholesterolemisuccinat  
 HisChol Histaminyl-Cholesterolemisuccinat  
 AC Acylcarnosin  
 Chems Cholesterylhemisuccinat  
 DPPC Dipalmitoylphosphatidylcholin  
 DPPG Dipalmitoylphosphatidylglycerol  
 POPC Palmitoyloleoylphosphatidylcholin  
 Chol Cholesterol

## Beispiel 1: Herstellung Dexamethason-Phosphat gefüllter Liposomen

[0021] Ein Gemisch aus 50 mol% DPPC, 10 mol% DPPC und 40 mol% Chol wird in Chloroform gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer im Vakuum vollständig getrocknet.

[0022] Der Lipidfilm wird mit soviel Dexamethason-Phosphat-Lösung (25mg/ml Dexamethason-Phosphat in 10mM Hepes, 150mM NaCl pH 7.5) versetzt, dass eine 100mM Suspension entsteht. Anschließend wird diese Suspension für 45 Minuten im Wasserbad bei 50°C unter Rotieren hydratisiert und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach wird die Lösung eingefroren. Nach dem Auftauen werden die Liposomen mehrfach durch eine Membran mit einer Porenweite von 400nm extrudiert. Die Abtrennung des nicht eingeschlossenen Dexamethason-Phosphates erfolgt über Gelfiltration.

[0023] Analog werden folgende Dexamethason-Phosphat gefüllten Liposomen hergestellt:

Lipid	mol%
POPC/MoChol/Chems	60:20:20
POPC/HisChol/Chems	60:20:20
POPC/DOTAP/Chems	60:10:30
POPC/HistChol/Chol	60:20:20
DPPC/AC/Chol	50:10:40

Tabelle 1: Beispiele möglicher Liposomenformulierungen für den Einschluss von wasserlöslichen Glucocorticoiden.

## Beispiel 2: Bestimmung der Freisetzung von Dexamethason-Phosphat

[0024] Liposomen wurden wie in Beispiel 1 hergestellt und mit Puffer (10mM Hepes, 150mM NaCl pH 7.5) auf eine Konzentration von 12mM Lipid verdünnt. Anschließend werden sie bei 37°C inkubiert. Aliquots dieser Inkubationslösung werden zu definierten Zeitpunkten (vgl. nachfolgende Tabelle) entnommen. Die entnommenen Aliquots werden mittels RP-HPLC auf ihren Gehalt an Dexamethason-Phosphat vermessen.

Formu- lierung	Lipid	mol%	0 Stunden	24 Stunden	120 Stunden
A	POPC/MoChol/Chems	60:20:20	4,6	10,5	10,0
	DPPC/DPPG/Chol	50:10:40	1,1	6,0	7,3
B	POPC/HisChol/Chems	60:20:20	6,7	14,1	10,8
C	POPC/DOTAP/Chems	60:10:30	4,4	4,2	-
	POPC/HistChol/Chol	60:20:20	8,7	7,0	-
	DPPC/AC/Chol	50:10:40	1,7	7,8	7,4

Tabelle 2: Freisetzung von Dexamethason-Phosphat zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inkubation bei 37°C in Puffer in % der eingeschlossenen Menge

[0025] Die unterschiedlichen Liposomen zeigen über den untersuchten Messzeitraum eine hinreichende Stabilität. Über einen Zeitraum von 5 Tagen werden weniger als 6, oft weniger als 4% des eingeschlossenen Wirkstoffs freigesetzt.

## Beispiel 3: Einsatz von liposomalem Dexamethason-Phosphat

[0026] In den Versuchstieren wurde entsprechend Buchner (Behandlung der antigeninduzierten Arthritis der Ratte mit Anti-Makrophagenprinzipien und monoklonalen Anti-CD4 Antikörpern. 1996. Dissertation. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. 129 S.) 1996) eine antigeninduzierte Arthritis ausgelöst. Die Arthritis wurde am Tag 0 entsprechend Buchner durch intraartikuläre Injektion des Antigens in den Synovialspalt im rechten Knie ausgelöst. Die arthritischen Tiere wurden 6, 24 und 48h nach Induktion der Arthritis intravenös mit liposomalem Dexamethason-Phosphat (Formulierung A, B, C, je 1 mg/kg) behandelt. Als Kontrolle dienen

freies Dexamethason-Phosphat (Formulierung K, ebenfalls 1 mg/kg) und physiologische Salzlösung (Saline). Die Wirkung der Probengabe wurde anhand folgender Parameter ermittelt:

- Bestimmung der Gelenkschwellung (vgl. Fig. 1)
- histologische Begutachtung von Entzündungsparametern und Parametern der Gelenkknorpelzerstörung (vgl. Fig. 2 und Tabelle 3)

[0027]

Formulierung	Grad der Knorpelzerstörung	Grad der Gelenkentzündung
Saline	4,0	5,5
Formulierung K	2,75	3,5
Formulierung A	0,25	0,25
Formulierung B	0	0,25
Formulierung C	1,0	1,5

Tabelle 3: Grad der Gelenkknorpelzerstörung und Gelenkentzündung der artbritischen Tiere nach Behandlung

0 – keine Veränderungen im Vergleich zum gesunden Knie

6 – starke Veränderungen im Vergleich zum gesunden Knie

[0028] Sowohl Gelenkknorpelzerstörung als auch Entzündungsreaktionen werden durch Behandlung mit liposomalem Dexamethason-Phosphat wirksam verringert. Freier Wirkstoff in der angegebenen Konzentration ist erheblich schlechter wirksam.

#### Patentansprüche

1. Liposomale Formulierung, **dadurch gekennzeichnet**, dass in der inneren wässrigen Phase der Liposomen wasserlösliche Glucocorticoide vorliegen und das die Liposomen keine amphiphilen Polymere wie Polyethylenglykol-Phosphatidylethanolamin umfassen.

2. Liposomale Formulierung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Liposomen Dipalmitoylphosphatidylcholin oder Distearoylphosphatidylcholin, Dipalmitoylphosphatidylglycerol oder Distearoylphosphatidylglycerol, Dipalmitoylphosphatidylserin oder Distearoylphosphatidylserin und Cholesterol umfassen.

3. Liposomale Formulierung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Phosphatidylglycerole oder Phosphatidylserine 5 bis 15mol% und Cholesterol 35 bis 50 mol% der Lipide ausmachen.

4. Liposomale Formulierung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Liposomen ihre Oberflächenladung mit dem pH-Wert ändern.

5. Liposomale Formulierung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Liposomen eine Grösse zwischen 150 und 500nm aufweisen.

6. Liposomale Formulierung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die wasserlöslichen Glucocorticoide deren Phosphatester, Glycoside oder Sulfatester sind.

7. Liposomale Formulierung nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die wasserlöslichen Glucocorticoide Dexamethasonphosphat, Prednisolonphosphat, Methylprednisolonphosphat, Prednisolonsuccinat, Methylprednisolonsuccinat, Bemethasonphosphat, Desonidphosphat, Hydrocortisonphosphat, Hydrocortisonsuccinat, Prednisolatmahydrochlorid, Prednisonphosphat oder Triamcinoloneacetonidphosphat sind.

8. Verwendung der liposomalen Formulierungen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche zur Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen.

9. Verwendung der liposomalen Formulierungen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche

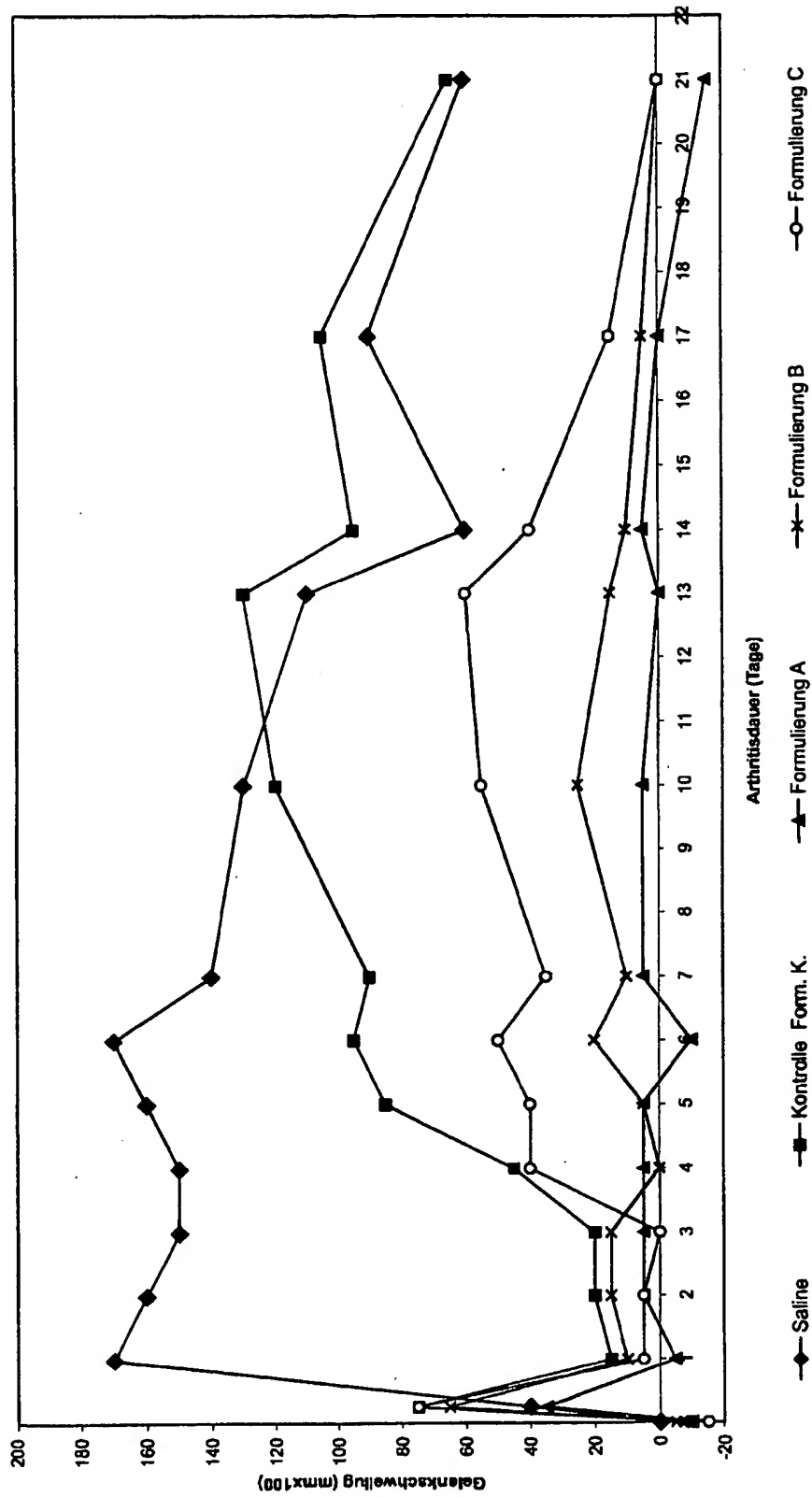
DE 102 55 106 A1 2004.06.09

che bei topischer, systemischer, oraler oder rektaler Applikation.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

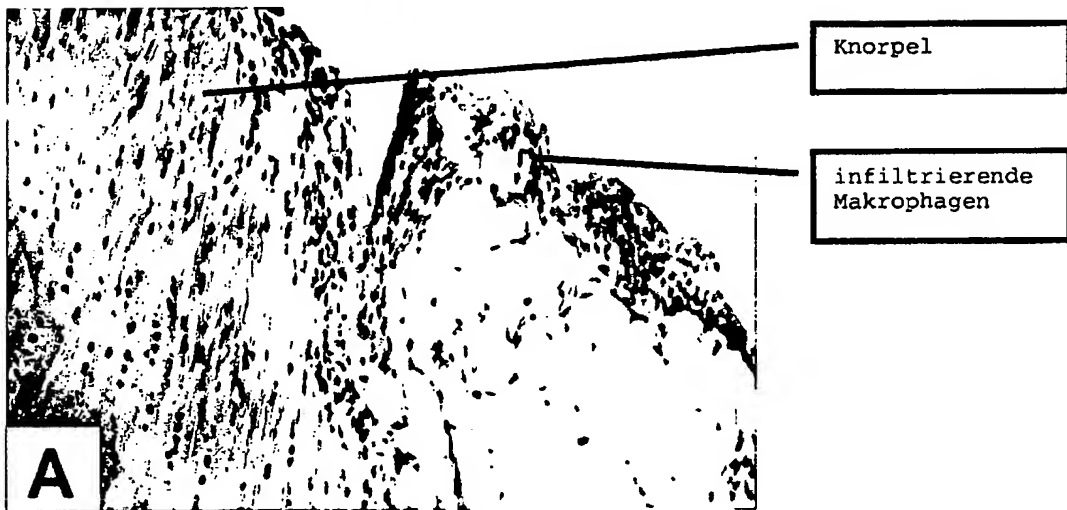
Anhängende Zeichnungen

re - li



FIGUR 1:

FIGUR 2:





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**